



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 196 35 645 C 2**

⑤① Int. Cl.⁷:
H 01 J 49/40

BG

②① Aktenzeichen: 196 35 645.8-33
②② Anmeldetag: 3. 9. 1996
④③ Offenlegungstag: 5. 3. 1998
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 28. 12. 2000

DE 196 35 645 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

⑦② **Erfinder:**
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

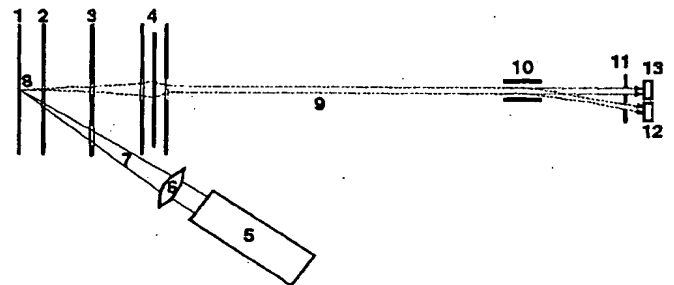
⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 39 40 900 A1
DE-OS 14 98 664
JP 62-40 150 A

"Rev. Sci. Instrum." 65 (1994) 1903-1911;
"Int. J. of Mass Spectrom and Ion Process" 136
(1994) 91-100;

⑤④ **Verfahren für die hochauflösende Spektrenaufnahme von Analytationen in einem linearen
Flugzeitmassenspektrometer**

⑤⑦ Verfahren für die hochauflösende Spektrenaufnahme
von Analytationen in einem linearen Flugzeitmassenspek-
trometer, bei dem am Ende der Flugstrecke des Flugzeit-
massenspektrometers vor einem Detektor für die Analy-
tationen durch die Kombination eines senkrecht zur Flug-
richtung orientierten elektrischen Feldes und einer rich-
tungsfilternden Blende eine Trennung der Analytationen
von anderen Teilchen vorgenommen wird, dadurch gek-
ennzeichnet, dass die nicht durch metastabilen Zerfall
fragmentierten Analytationen von ihren Fragmentationen
und Neutralfragmenten getrennt werden und dass für
diese Trennung ein stationäres, zeitlich konstantes elektri-
sches Feld verwendet wird, welches die unzerfallenen
Analytationen so ablenkt, dass sie die richtungsfilternde
Blende passieren können, um anschließend am Detektor
nachgewiesen zu werden.



DE 196 35 645 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die hochauflösende Spektrennahme von Analytione in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer. Ein solches Verfahren ist aus "A laser vaporization, laser ionization time-of-flight mass spectrometer for the probing of fragile biomolecules", D. E. Schilke und R. J. Levis, Rev. Sci. Instrum. 65, 1903-1911 (1994), bekannt.

In der Offenlegungsschrift DE 196 35 643 A1 wird ein lineares Flugzeitmasspektrometer vorgestellt, das durch Fokussierung zweiter Ordnung außerordentlich hohe Auflösungsvermögen auch bei sehr großen Ionenmassen erzielen kann. Diese durch Computersimulation erzielbaren Auflösungsvermögen lassen sich jedoch in der Praxis nicht verifizieren, da verschiedene Einflüsse das erzielbare Auflösungsvermögen begrenzen.

Einer der Haupteinflüsse für die Begrenzung des Auflösungsvermögens liegt darin, daß in der Ionenquelle für die Erzeugung sehr großer Ionen aus entsprechenden Analytsubstanzen sehr viele metastabile Ionen entstehen, die nach Verlassen der Ionenquelle in der Flugstrecke zerfallen und dabei sowohl neutrale wie auch geladene Fragmente bilden. Dieser Prozess ist besonders für die Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption und Ionisation ("MALDI") als "post source decay" (PSD) bekannt geworden. Ein massenspektrometrisches Verfahren für die Untersuchung zerfallender Analytione mit einem schräggestellten Reflektor wird in JP 62-40150 (A) mit Anmeldepriorität vom 14.8.1985 vorgestellt.

Die im metastabilen Zerfall gebildeten Bruchstücke fliegen im wesentlichen mit der gleichen Geschwindigkeit weiter, die das zerfallene Elternion hatte. Sie erreichen den am Ende der Flugstrecke befindlichen Detektor also im wesentlichen zur gleichen Zeit wie die nicht zerfallenen Ionen der gleichen Startmasse und verstärken im Prinzip deren detektiertes Signal.

Beim metastabilen Zerfall der Ionen erhalten aber die jeweiligen Bruchstücke kinetische Energien von einigen Zehnteln Elektronenvolt, die je nach Zerfallsrichtung entweder zu einer leichten Querbeschleunigung, zu einer Abbremsung oder zu einer Beschleunigung der Bruchstücke führen. Damit findet neben einer leichten örtlichen besonders auch eine zeitliche Verschmierung des Ionensignals am Detektor statt, die Massenauflösung ist herabgesetzt.

Der metastabile Zerfall folgt einer abfallenden Exponentialfunktion. Es finden also kurz nach Verlassen der Ionenquelle mehr Zerfälle statt als später. Diese frühen Zerfälle verbreitern aber das Massensignal stärker, da sich die leichte Geschwindigkeitsabweichung, die beim Zerfall erhalten wird, über eine längere Flugstrecke hinweg in einer größeren Flugzeitabweichung bemerkbar macht.

Der genaue Ionisierungsprozess, insbesondere der durch MALDI, und die Erzielung der Hochauflösung durch verzögerte dynamische Beschleunigung sind in der Offenlegungsschrift DE 196 35 643 A1 beschrieben.

Um die hohe Massenauflösung, die mit der erwähnten Methode erzielt werden kann, auch gut ausnutzen und messen zu können, ist es im Prinzip möglich, die Flugzeiten durch Herabsetzen der Beschleunigungsspannung zu vergrößern. Wird beispielsweise die Beschleunigungsspannung geviertelt, so verdoppelt sich die Flugzeit. Einflüsse des Detektors auf die Signalbreite der Ionenmassen verringern sich (heutige Vielkanal-Elektronenervielfacher erzeugen von sich aus Signalbreiten zwischen einer und drei Nanosekunden). Diese Methode hat aber den Nachteil, daß sich die Empfindlichkeit des Detektors für den Nachweis großer Ionenmassen drastisch verringert, wenn keine Nachbeschleunigung der Ionen vorgenommen wird. Außerdem besteht der Nachteil, daß die Signalverbreiterungen durch die metastabilen Zerfälle relativ gesehen stärker werden und daher die Auflösung stärker begrenzen.

nigung der Ionen vorgenommen wird. Außerdem besteht der Nachteil, daß die Signalverbreiterungen durch die metastabilen Zerfälle relativ gesehen stärker werden und daher die Auflösung stärker begrenzen.

Nachbeschleunigungen der Ionen sind verschiedentlich versucht worden, waren aber jeweils mit so starken Nachteilen behaftet, daß die Versuche allgemein aufgegeben wurden. Nachbeschleunigungen bedürfen eines scharfen Einsatzes, der in der Regel durch ein Gitter kurz vor dem Detektor erzeugt wurde. Die Nachbeschleunigung fand also zwischen Gitter und Detektor statt. Gitter und Ionenfragmente erzeugen aber Geistersignale. Ionen, die das Gitter treffen, zerfallen und führen zu einer ersten Art von Geistersignalen vor dem Hauptsignal auf Grund von gittererzeugten Fragmentationen, die in der Nachbeschleunigungsstrecke zu höherer Geschwindigkeit gebracht werden. Aber auch die metastabil erzeugten neutralen Fragmente, die keiner Nachbeschleunigung unterliegen, erzeugen Geistersignale. Und die metastabil erzeugten Fragmente ergeben in der Nachbeschleunigungsstrecke weitere, sehr komplexe Geistersignale bis hin zu einem quasikontinuierlichen Untergrund. Die beiden letztgenannten Arten von Geistersignalen ergeben sich auch bei gitterfreien Blendenanordnungen zur Nachbeschleunigung.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren für die hochauflösende Spektrennahme in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer zu finden, das zerfallene und unzerfallene Analytione zu trennen erlaubt und die unzerfallenen Ionen mit höchster Auflösung und höchster Empfindlichkeit messen kann.

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, den Ionenstrahl möglichst gut zu parallelisieren und dann durch ein elektrisches Feld seitlich so abzulenken, daß die Geschwindigkeit der Ionen in der Achsenrichtung der Flugstrecke nicht gestört wird. Durch entsprechendes Ausblenden können dann die unzerfallenen Ionen von den Neutralbruchstücken und den Tochterionen getrennt werden und auch getrennt nachgewiesen werden. Die Detektorfläche muß dabei nach wie vor genau senkrecht zur Achsenrichtung der Flugstrecke ausgerichtet sein.

Leichte Reststörungen der Vorwärtsgeschwindigkeit bei der Querablenkung durch das elektrische Feld fallen umso weniger ins Gewicht, je näher die Ablenkungsvorrichtung am Detektor angeordnet ist. Andererseits muß die Ablenkungsvorrichtung möglichst weit vom Detektor lokalisiert sein, um eine gute Richtungsablenkung zu erhalten, es ist aber nicht für den Fachmann nicht schwer, für den Abstand einen für seine spezielle Aufgabenstellung günstigen Kompromiss zu finden.

Es ist ein weiterer Gedanke der Erfindung, die ausgeblenden, unzerfallenen Ionen durch eine gitterfreie Nachbeschleunigung in einer relativ kurzen Nachbeschleunigungsstrecke auf sehr hohe kinetische Energien zu bringen, um bei hohen Ionenmassen zu ausreichender Empfindlichkeit zu kommen.

Es ist ein weiterer Gedanke der Erfindung, die Neutralbruchstücke, die in Geradeausrichtung weiterfliegen, durch einen zweiten Detektor mitzumessen, um Aussagen über die Stabilität der Analytione zu bekommen.

Auch Teilströme der Tochterionen aus metastabilen Zerfällen können in weiteren Detektoren gemessen werden, wobei allerdings nur grobe Aussagen über deren Massen gemacht werden können.

Fig. 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines linearen Flugzeitmassenspektrometers mit einer hochauflösenden Ionen-detektion nach dieser Erfindung.

Die Probenträgelektrode 1 trägt die oberflächlich aufgetragene Analytsubstanz 8. Ein Lichtblitz aus dem Laser 5

wird von der Linse 6 in einem konvergenten Lichtstrahl 7 auf die Probe 8 fokussiert. Der Lichtblitz erzeugt in einem MALDI-Prozess Ionen der Analytsubstanz, die nach einer Verzögerungszeit im Raum zwischen dem Probenträger 1 und der Zwischenblende 2 dynamisch beschleunigt werden, im Raum zwischen der Zwischenblende 2 und der Grundelektrode 3 weiter beschleunigt und in die Flugstrecke des Massenspektrometers, die sich zwischen Grundelektrode 3 und Ionendetektor 12 befindet, eingeschossen werden. Die Einzellinse 4 parallelisiert den Ionenstrahl 9.

Um die unzerfallenen Analytionen ausfiltern zu können, wird der Ionenstrahl 9 im Plattenkondensator 10 seitlich ausgelenkt und durch die richtungsfilternde Blende 11 von den zerfallenen Fragmentionen, die stärker abgelenkt werden (in Fig. 1 nicht gezeigt), befreit. Diese nicht zerfallenen Ionen werden im Detektor 12 gemessen.

Die neutralen Fragmente können in Geradeausrichtung mit einem zweiten Detektor 13 ebenfalls gemessen werden.

Die Fig. 1 zeigt somit den prinzipiellen Aufbau eines linearen Flugzeitmassenspektrometers mit einer Ionendetektion nach dieser Erfindung. Das Flugzeitmassenspektrometer hat eine MALDI-Ionenquelle mit einer Zwischenblende, wie sie zur Erzeugung der Hochauflösung verwendet werden kann. Es wird hier eine gitterfreie Ionenquelle mit einer nachfolgenden Einzellinse dargestellt, die sich besonders gut zur Erzeugung eines parallelen Ionenstrahls ohne Kleinkwinkelstreuungen eignet. Die Erfindung ist aber nicht auf diese Anordnungen allein beschränkt, auch Massenspektrometer mit anderen Arten von Ionenquellen, und auch mit Ionenquellen mit Gittern können durch diese Erfindung in der Zeit- und Massenauflösung ihrer Ionendetektion verbessert werden.

Es wird hier darauf verzichtet, die Erzeugung der Ionen und ihre besondere Zeitfokussierung, die zur Hochauflösung führt, im Einzelnen zu beschreiben. Diese kann in der erwähnten Offenlegungsschrift DE 196 35 643 A1 nachgelesen werden.

Fig. 2 zeigt nähere Einzelheiten dieser Erfindung. So kann der zentrale Hauptteil des parallelen Ionenstrahls 9 vor dem Plattenkondensator 10 durch eine abstreiferartig ausgebildete Blende 14 relativ fein ausgeblendet werden. Blende 14 und Abschlußblende 15 bilden sogenannte Herzog-Shunts, die die elektrischen Randfelder des Plattenkondensators und ihre negativen Auswirkungen auf den Ionenstrahl 9 begrenzen. Auch die Blende 11 ist hier als Abstreifer ausgebildet, um die Wirkung möglicher Aufladungen der Oberfläche auf den Ionenstrahl zu vermindern. Zwischen der Blende 11, die sich kurz vor dem Ionendetektor 12 befindet, und dem Ionendetektor 12 kann ohne Nachteile eine Hochspannung zur Nachbeschleunigung der Ionen angelegt werden, um die Empfindlichkeit des Ionennachweises zu steigern.

Der durch die Gitter, im Falle einer gitterlosen Ionenquelle durch die Linse 4, sehr gut parallelisierte Ionenstrahl wird nach dieser Erfindung in dem Plattenkondensator 10 seitlich abgelenkt. Es wird dabei ein Plattenkondensator benutzt, der im Inneren keinerlei elektrische Feldstärke in der ursprünglichen Flugrichtung der Ionen aufweist, um den Ionen keine zusätzliche Geschwindigkeit in der Achsenrichtung der Flugstrecke zu vermitteln. Die Feldstärken in Achsenrichtung, die unvermeidbar am Eingang und Ausgang durch die Streufelder des Kondensators vorliegen, können durch ionenoptische Hilfsglieder 14 und 15, sogenannte Herzog-Shunts oder Streufeldkurzschlüsse, in bekannter Weise minimiert werden.

Der abgelenkte Ionenstrahl fächert sich auf, die unzerfallenen Ionen, die am schwersten sind, bilden dabei den schennächsten Ionenstrahl. Die Fragmentionen, deren Energie

gemäß der Massenabspaltung geringer geworden ist, werden stärker abgelenkt. Die unzerfallenen Ionen können nun durch eine Blende ausgeblendet und mit dem Detektor 12 gemessen werden.

Die Detektorfläche muß natürlich genau senkrecht zur ursprünglichen Flugrichtung ausgerichtet sein, da nur die Flugzeit der Ionen in dieser Richtung gemessen werden soll.

Die Ausblendung der unzerfallenen Ionen kann nicht immer vollständig sein. Zum einen können Fragmentionen, die durch Zerfälle nach Durchlaufen des Plattenkondensators entstehen, nicht ausgeblendet werden. Diese werden also immer noch zu einer Zeitverschmierung beitragen. Da jedoch die Wegstrecke vom Zerfall bis zur Detektion nicht sehr lang ist, können sich die leichten Geschwindigkeitsunterschiede durch die Zerfallsenergie nur wenig auswirken.

Zum anderen können Fragmentionen, die nur ein sehr leichtes Neutralbruchstück, beispielsweise Wasserstoff (Masse 2 u) oder auch Wasser (Masse 18 u), verloren haben, ebenfalls nicht vollständig ausgeblendet werden. In diesem Fall hat aber das schwere Fragmention nach dem Satz der Impulserhaltung nur eine winzige Geschwindigkeitsänderung erfahren, es trägt daher auch zur Zeitverschmierung nur sehr wenig bei. – Die Auflösung der Richtungs- und Massenfilterung durch die Blende hängt von der Breite des parallelen Ionenstrahls ab. Durch Beschränkung auf einen schmalen Kernbereich durch eine Blende 14 vor dem Plattenkondensator kann die Massenauflösung optimiert werden. Diese Blende 14 ist zweckmäßigerweise als Abstreifer auszuführen, damit eventuelle Oberflächenaufladungen den Ionenstrahl nicht beeinflussen können.

Die Querablenkung mit Ausblendung der unzerfallenen Ionen ist daher ein gutes Mittel, die Zeitverschmierung durch Fragmente zu beseitigen.

Die Neutralbruchstücke werden vom Kondensator nicht abgelenkt und fliegen weiter geradeaus. Sie können in dieser Richtung mit einem eigenen Detektor gemessen werden. Das Spektrum der abgespaltenen Neutralbruchstücke ist durchaus sehr interessant. Es werden zwar die Massen der Neutralbruchstücke nicht gemessen, doch erhält man darüber Aussagen, welche der stabil gemessenen Ionen Verluste durch metastabile Prozesse erlitten haben.

Auch die stärker abgelenkten Fragmentionen können im Prinzip durch eigene Detektoren nachgewiesen werden.

Besonders interessant ist bei dieser Anordnung, daß es nun (fast) ohne das Auftreten von Geistersignalen möglich ist, die Ionen nachzubeschleunigen. Es können beispielsweise die Ionen in der Ionenquelle mit nur sechs Kilovolt beschleunigt werden, in der Nachbeschleunigungsstrecke aber auf 50 Kilovolt. Damit wird die Flugzeit länger, und bei gleicher Zeitverschmierung des Detektors kann ein höheres Zeitaufklärungsvermögen erreicht werden. Die Ionenquelle ist häufig zu belüften, Proben sind einzubringen, daher ist die Anwendung der Hochspannung in der Ionenquellenregion viel schwieriger als in der Detektorregion, die stets auf Ultrahochvakuum gehalten werden kann.

Die wenigen, durch die oben bereits angeführten Gründe verbleibenden Geistersignale können beispielsweise durch einen Vergleich des Ionenspektrums mit dem Neutralbruchstückspektrum erkannt und so eliminiert werden.

Der durch den Ionenstrahl gegebene zeitvariable Ionenstrom wird am Detektor gewöhnlich mit einer Abtastrate von 1 oder 2 Gigahertz gemessen und digitalisiert. Transientenrekorder mit noch höherer zeitlicher Auflösung werden in Kürze eingesetzt werden können. Üblicherweise werden die zeitgleichen Meßwerte aus mehreren Spektrenaufnahmen addiert, bevor die Massenlinien in den gespeicherten Daten gesucht und über die Datenauswertung von der Zeitskala über die Massenkalkibrierkurve in die Massenwerte

transformiert werden.

Die Polarität der verwendeten Hochspannung für die Ionenbeschleunigung muß gleich der Polarität der untersuchten Ionen sein: Positive Ionen werden durch einen positiv geladenen Probenträger abgestoßen und beschleunigt, negative Ionen durch einen negativ geladenen Probenträger. 5

Selbstverständlich kann man das Flugzeitmassenspektrometer auch so betreiben, daß sich die Flugstrecke in einem (nicht in Fig. 1 gezeigten) Rohr befindet, das sich auf dem Beschleunigungspotential U befindet, während der Probenträger 1 auf Erdpotential liegt. In diesem besonderen Fall liegt das Flugrohr auf positivem Potential, wenn negativ geladene Ionen untersucht werden sollen, und umgekehrt. Dieser Betrieb vereinfacht die Konstruktion der Ionenquelle, da die Isolatoren für den Halter des auswechselbaren Probenträgers 1 entfallen können. Es muß in diesem Fall der Ablenk Kondensator 10 auf der Hochspannung der Flugstrecke betrieben werden. 15

Patentansprüche

20

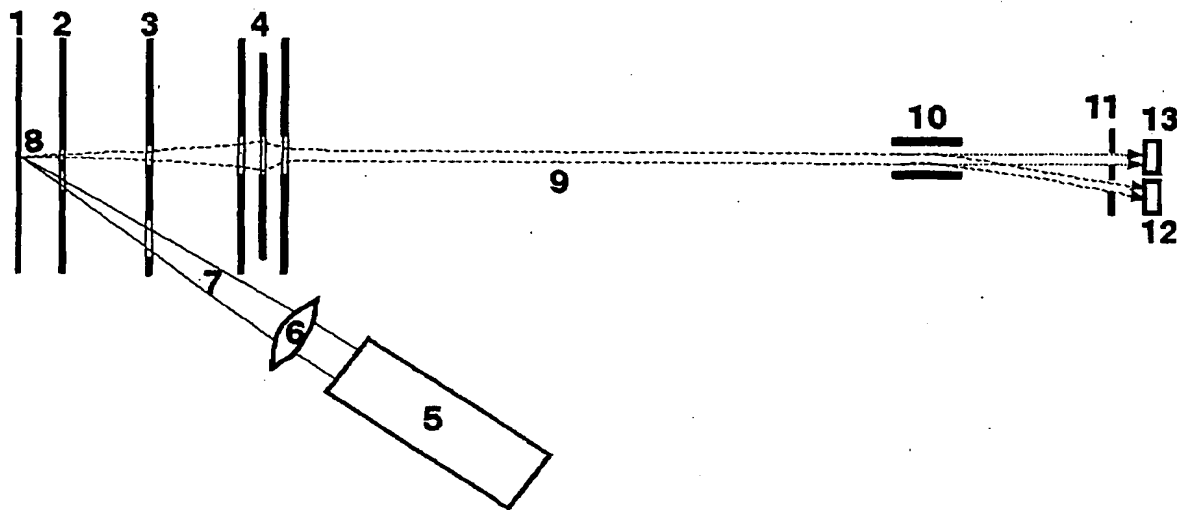
1. Verfahren für die hochauflösende Spektrenaufnahme von Analytationen in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer, bei dem am Ende der Flugstrecke des Flugzeitmassenspektrometers vor einem Detektor 25 für die Analytationen durch die Kombination eines senkrecht zur Flugrichtung orientierten elektrischen Feldes und einer richtungsfilternden Blende eine Trennung der Analytationen von anderen Teilchen vorgenommen wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass die nicht durch metastabilen Zerfall fragmentierten Analytationen von ihren Fragmentationen und Neutralfragmenten getrennt werden und dass für diese Trennung ein stationäres, zeitlich konstantes elektrisches Feld verwendet wird, welches die unzerfallenen Analytationen so ablenkt, dass sie 35 die richtungsfilternde Blende passieren können, um anschließend am Detektor nachgewiesen zu werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht metastabil zerfallenen Analytationen zwischen der richtungsfilternden Blende und dem Detektor auf hohe Energien nachbeschleunigt werden. 40
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in Geradeausrichtung fliegenden Neutralfragmente durch einen eigenen Detektor ebenfalls nachgewiesen werden. 45
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß auch die im elektrischen Feld stärker abgelenkten Fragmentationen durch einen oder mehrere eigene Detektoren nachgewiesen werden. 50
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrische Ablenkung in einem Parallelkondensator erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Parallelkondensator eingangs- und ausgangsseitig durch Streufeld-Shunts abgeschlossen wird. 55

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

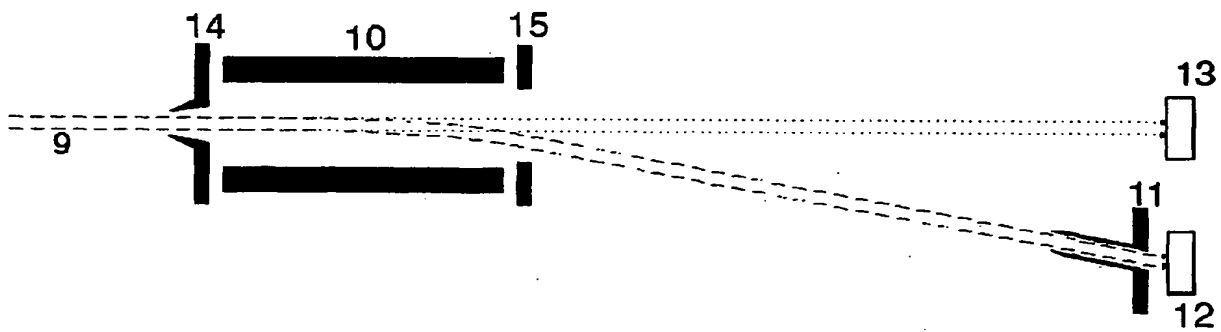
60

65

- Leerseite -



Figur 1



Figur 2